

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Bioquímica. Madrid.

Método fluorofotométrico para la valoración de lactoflavina

por JOSÉ M.^a ALONSO SAMANIEGO y DOLORES LORENZO SALGADO

(Recibida para publicar el 30 de Abril de 1947)

Los métodos modernos de valoraciones fluorofotométricas están basados en la producción de sustancias fluorescentes, en el seno de una solución, que pueden medirse con una sensibilidad y especificidad que no alcanzan los métodos colorimétricos ordinarios. La concentración de la sustancia fluorescente se obtiene por iluminación de ésta con radiaciones ultravioleta y se mide o se compara la intensidad de la luz emitida.

La intensidad de la fluorescencia es una función de un cierto número de variables según la siguiente ecuación :

$$F = A I_0 (1 - 10^{-KCL})$$

F = intensidad de fluorescencia

I_0 = Intensidad de las radiaciones incidentes

A = Fracción de las radiaciones absorbidas

K = Constante (depende de cada sustancia en particular, disolventes, longitudes de onda, etc.)

C = Concentración de sustancia fluorescente

L = Espesor de la solución en la cubeta

Si el exponente KCL es muy pequeño, menos de 0,1, la anterior ecuación se transforma en

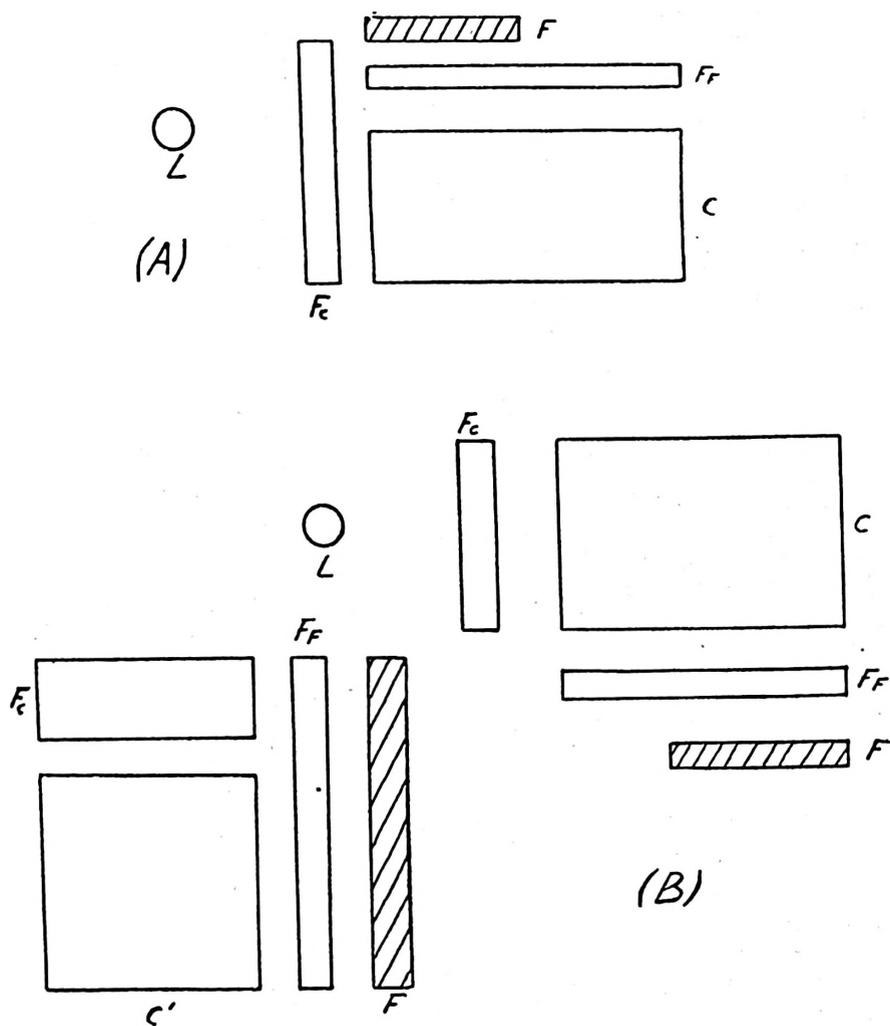
$$F = 2,3 A I_0 KCL$$

y F es directamente proporcional a la concentración.

Las soluciones de sustancias fluorescentes demuestran su máximo de fluorescencia a determinada concentración, por encima de la cual disminuye la fluorescencia, por lo que debe tenerse cuidado en

las técnicas fluorométricas, en trabajar en una proximidad por defecto al máximo de intensidad de la curva de concentración.

La medida o comparación de la intensidad de fluorescencia puede hacerse con colorímetros modificados o bien con el fotómetro de Pulfrich, pero son más exactos los valores obtenidos utilizando



aparatos especiales en los cuales se emplean células fotoeléctricas y galvanómetro para medir la intensidad de la luz emitida.

Los fluorómetros son de dos tipos, según tengan una o dos fotocélulas. Las partes más importantes de estos aparatos están representados en la figura 1.

(A) representa el esquema de un fluorómetro de sola una célula, en el cual L es la fuente de luz ultravioleta, C es la cubeta donde se

ponen alternativamente la solución de referencia y la del problema, F_0 es el filtro de la cubeta y F_1 el de la fotocélula.

La diferencia de este aparato con el (B) consiste en que éste tiene dos cámaras en las que se ponen a la vez las soluciones testigo y problema, teniendo cada una sus correspondiente filtros y fotocélulas. Los filtros F_0 se usan con el fin de aislar de la luz ultravioleta emitida por la lámpara las radiaciones de longitud de onda deseada, eliminando las que no interesan. Para la mayor intensidad de fluorescencia la longitud de onda de las radiaciones ultravioletas, debe estar próxima a la longitud de onda del máximo de absorción demostrado por la solución.

Los filtros F_1 tienen por objeto el absorber la luz ultravioleta reflejada o dispersada por las partículas en suspensión, dando paso solamente a las radiaciones de fluorescencia. En el caso de que haya en solución alguna otra sustancia fluorescente pueden usarse filtros que absorban también las emisiones de estas impurezas y dejen sólo pasar las de la sustancia problema.

En cuanto a la medida de esa luz fluorescente puede hacerse por dos medios: bien comparando la fluorescencia con la producida por sustancia de fluorescencia conocida (fluoresceína, sulfato de quinina, etc.), o bien construyendo curvas a base de los valores obtenidos por lectura de soluciones con distinta concentración de la sustancia problema.

Como es lógico suponer las fluorometrías por comparación visual son menos exactas, ya que no se eliminan las apreciaciones subjetivas: sin embargo, en algunos casos son imprescindibles: así sucede cuando la cantidad absoluta de sustancia fluorescente es muy pequeña y no se pueden conseguir volúmenes de solución que excedan a un c. c., en cuyo caso no es posible usar las cubetas o tubos de fluorofotometría.

Pueden distinguirse perfectamente soluciones con una diferencia en la fluorescencia del 10 % si se opera en la cifra óptima de concentración. Debe evitarse el empleo de soluciones que den demasiada fluorescencia, porque entonces no se distinguen diferencias del 10 %, y aun mayores. La concentración óptima para las determinaciones fluorofotométricas, debe ser unas diez veces superior a la dilución que manifiesta un mínimo de fluorescencia visible.

La sensibilidad visual de una reacción fluorescente puede hacerse estableciendo la más pequeña cantidad de la sustancia en una columna de solución de un cm^2 en la dirección de la vista, que es suficiente para dar una fluorescencia perceptiblemente mayor, pero muy próxima a la del ensayo en blanco.

En las fluorofotometrías se usan lámparas que proporcionen un gran área de radiaciones.

Deben especificarse en cada caso las condiciones de la observación, particularmente la intensidad y la longitud de onda de las radiaciones ultravioletas. En otros casos la intensidad de la luz es de secundaria importancia, porque el ensayo en blanco puede dar una fluorescencia apreciable debido al disolvente (caso de líquidos

orgánicos como cloroformo, alcohol, acetona, etc.), o bien al reactivo.

Puesto que en algunos casos puede dar fluorescencia el solvente, la sensibilidad de fluorescencia puede no ser independiente del espesor o profundidad de la capa a examinar.

La sensibilidad de las reacciones fluorescentes es extraordinaria en algunos casos, depende del tipo de reacción, de la naturaleza de la sustancia fluorescente y de las características del aparato usado para la determinación. En este último caso no depende del mecanismo medidor de luz, sino más bien de los dispositivos que reproducen esas mediciones en la escala del galvanómetro. El ajuste perfecto del cero en las determinaciones fluorimétricas tiene gran importancia.

Refiriéndonos ahora a los errores de los métodos fluorométricos podemos decir que son bastante menores a los de colorimetrías ordinarias, pero tienen el inconveniente de que, como hemos dicho, puede haber sustancias en el seno de la solución que den fluorescencia o bien que absorban las radiaciones ultravioleta (ión cromato, por ejemplo) o en otros casos que absorban la luz fluorescente emitida por la sustancia a valorar. Todas estas interferencias hay que tenerlas en cuenta y procurar eliminarlas.

PARTE EXPERIMENTAL

A) Descripción del aparato.

El aparato usado por nosotros en las evaluaciones es un fluoro fotómetro de Pfaltz and Bauer con dispositivos para fotolorimetrías y nefelometrías.

La fuente de luz es una lámpara de mercurio (Mazda H-3) que atraviesa un condensador y una cámara para filtros o cubetas (según los casos) antes de incidir en la cubeta de fluorescencia. Entre el condensador y la cámara de filtro hay un diafragma para regular el espesor del haz.

Paralelamente al eje mayor de la cubeta está una fotocélula redonda (BARRIER LAYER) que trabaja en el caso de fluorometrías. Entre la cubeta y la fotocélula existen unas ranuras para la colocación de filtros.

En el caso de que el aparato se use como colorímetro o nefelómetro actúa otra fotocélula de forma rectangular colocada en la cara posterior paralela a la que recibe los rayos incidentes.

Las fotocélulas están conectadas a través de un reóstato con un galvanómetro de espejos múltiples.

Debido a que la vida de la lámpara de mercurio es limitada, es necesario verificar todos los días una comprobación del apa-

rato por medio de soluciones «tipo» preparadas con toda es-
crupulosidad, o bien compensando con el diafragma la luz ul-
travioleta incidente. La elección de un sistema u otro debe
hacerse según la cualitativa a realizar.

B) Valoración de la lactoflavina.

El método seguido por nosotros es una modificación del de
Hodson y Morris, y en el cual se valora la fluorescencia de una
solución de riboflavina (en el caso de que se trate de vitami-
na B₂ pura) y haciendo la correspondiente extracción cuando se
trate de productos naturales o bien de preparados farmacéuti-
cos como tabletas, granulados, cápsulas, etc.

Para seguir este procedimiento hemos construido unas grá-
ficas con las distintas lecturas de diferentes soluciones de lacto-
flavina; de esta forma, para la evaluación de un problema pue-
de verse rápidamente la concentración de vitamina B₂ que co-
rresponde.

La disposición del aparato se hace colocando los siguientes
filtros:

Filtro n.º 511 }
Filtro n.º 038 } entre la lámpara y la cubeta
Filtro n.º 368 — entre la cubeta y la fotocélula

(La numeración de estos filtros es la adaptada por Cor-
ning Glass Works) y que dan una máxima transmisión de
aproximadamente 440 mμ.

Hemos preparado una escala de 30 soluciones de vitami-
na B₂ en agua destilada conteniendo desde 0'4 γ por c. c. has-
ta 0'002 γ por c. c.

Encendida la lámpara y dejados pasar 10 minutos para que
la intensidad de la luz emitida fuera la máxima, realizamos las
lecturas de cada solución, colocando el iris del diafragma en
posición 30. Los valores obtenidos determinan la recta A) de
la gráfica 1.

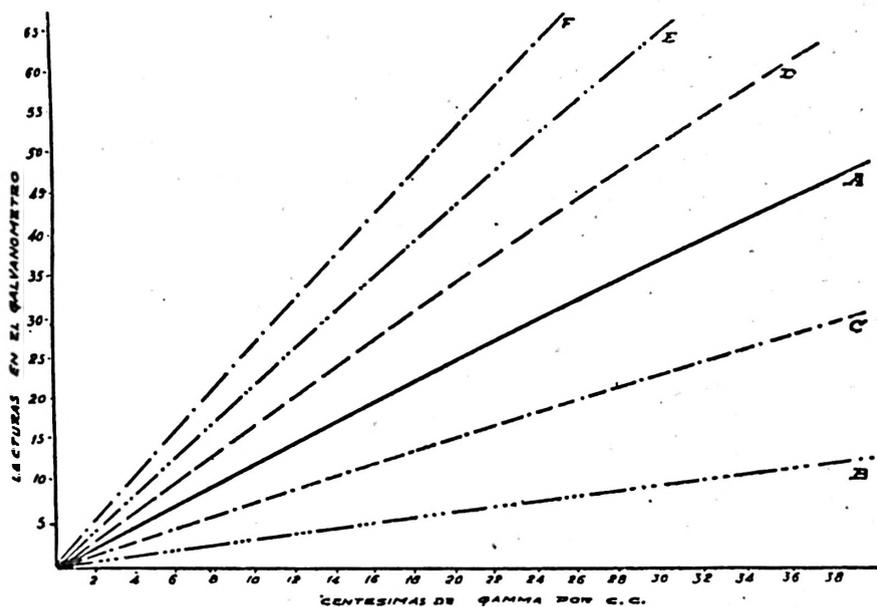
Con el fin de comprobar si con distintos diafragmas la cur-
va de valores era también una recta, hacemos las lecturas co-
locando el iris en posiciones 10, 20, 40, 50 y 60. Las gráficas
son las rectas B), C), D), E) y F).

Es curioso el hecho de que a una apertura de diafragma
múltiplo de otra corresponde una gráfica que forma con el eje
de abscisas un ángulo igualmente múltiplo.

Una vez construidas las gráficas, para determinar una solu-

ción problema de lactoflavina, verificamos las siguientes operaciones:

Efectuamos una lectura con una solución «standard» (nosotros elegimos para este fin una solución conteniendo 0'1 y por centímetro cúbico); abriendo o cerrando el diafragma, conseguimos que el valor que nos dé coincida con el que esa solución tiene en la gráfica que adaptamos (nosotros utilizamos las ob-



Gráfica 1

tenidas con los diafragmas 30 y 40, preferentemente la primera). Esta operación es necesaria, porque, como decíamos, la intensidad de la lámpara disminuye y debe compensarse con el diafragma.

Una vez verificada la regulación del aparato, se hace la lectura con el líquido problema; se determina su concentración directamente en el caso de que la dilución de la muestra se haya preparado de forma que la cantidad de lactoflavina por centímetro cúbico esté comprendida en los valores de la gráfica, de otro modo será necesario hacer tanteos previos.

Cuando el problema a valorar no es sólo lactoflavina pura (caso de productos naturales o de preparados farmacéuticos

como tabletas, granulados, etc.) es imprescindible extraer la riboflavina de la siguiente forma :

Se pone el material a extraer en un erlenmeyer de 250 c. c. y se añaden 50 c. c. de $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 0'1 N. Se hierve suavemente a reflujo durante media hora y se deja enfriar. Se ajusta el pH a 4 — 4'5 con acetato sódico 1'5 N. Se adiciona agua destilada hasta completar un volumen de 200 c. c. y se filtra la solución. Se añade 1 c. c. de MnO^4K , unas gotas de acético y 1 c. c. de $\text{H}_2 \text{O}_2$ (con el fin de destruir posibles impurezas absorbentes de luz o fluorescentes), se agita bien y se pone agua destilada en cantidad suficiente para que la dilución de la lactoflavina sea aproximadamente de 0,1 y por c. c.

La presencia de vitamina B_1 no influye en la determinación de la lactoflavina, como lo comprobamos haciendo varias lecturas de soluciones de lactoflavina antes y después de añadir soluciones variables de vitamina B_1 como se ve en el cuadro II.

CUADRO II.

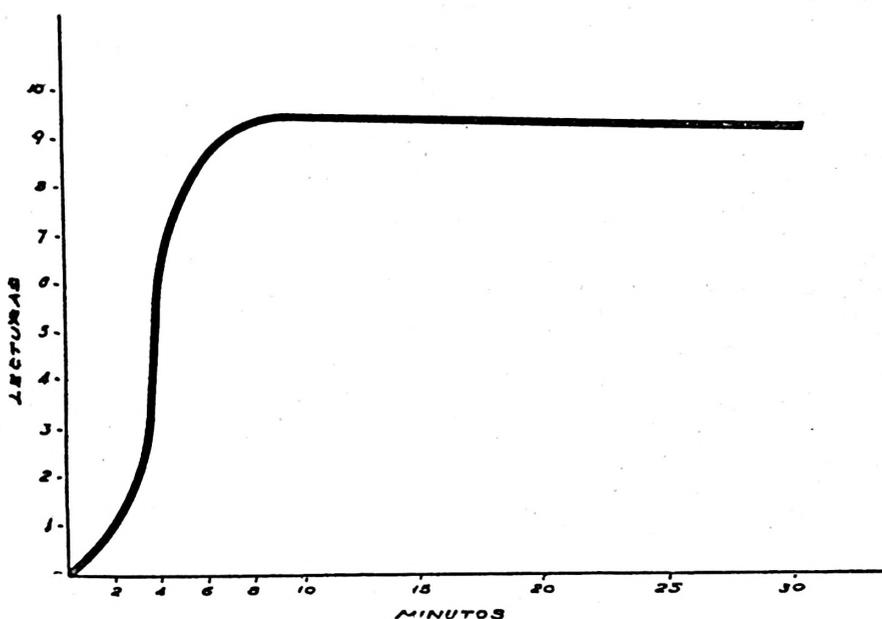
Muestra	Sin vit. B_1	Con 0'5 mg. de vit. B_1	Con 1 mg. de vit. B_1	Con 2 mg. de vit. B_1
Núm. 1	8	8	8	8
Núm. 2	15	15	15	15
Núm. 3	26	26	26	26
Núm. 4	32	32	32	32
Núm. 5	44	44	44'5	44

C) *Determinación del tiempo de máxima intensidad de luz.*

Con el fin de determinar el tiempo necesario para que la lámpara adquiriera su máximo de intensidad se hizo la siguiente prueba :

Se enciende el aparato durante media hora, se apaga y se deja luego enfriar hasta que la temperatura de la lámpara sea la de la habitación. Se vuelve a encender y se pone en la cubeta una solución con una concentración conocida de lactoflavina.

Las lecturas se realizan cada minuto. Los valores pueden verse en la gráfica 2. Se observará que el máximo se alcanza a los 7 minutos aproximadamente, por lo que el compás de espera



Gráfica 2

de 10 minutos que nosotros dejábamos para nuestras determinaciones era más que suficiente.

D) *Dstrucción de la lactoflavina a distintos pH.*

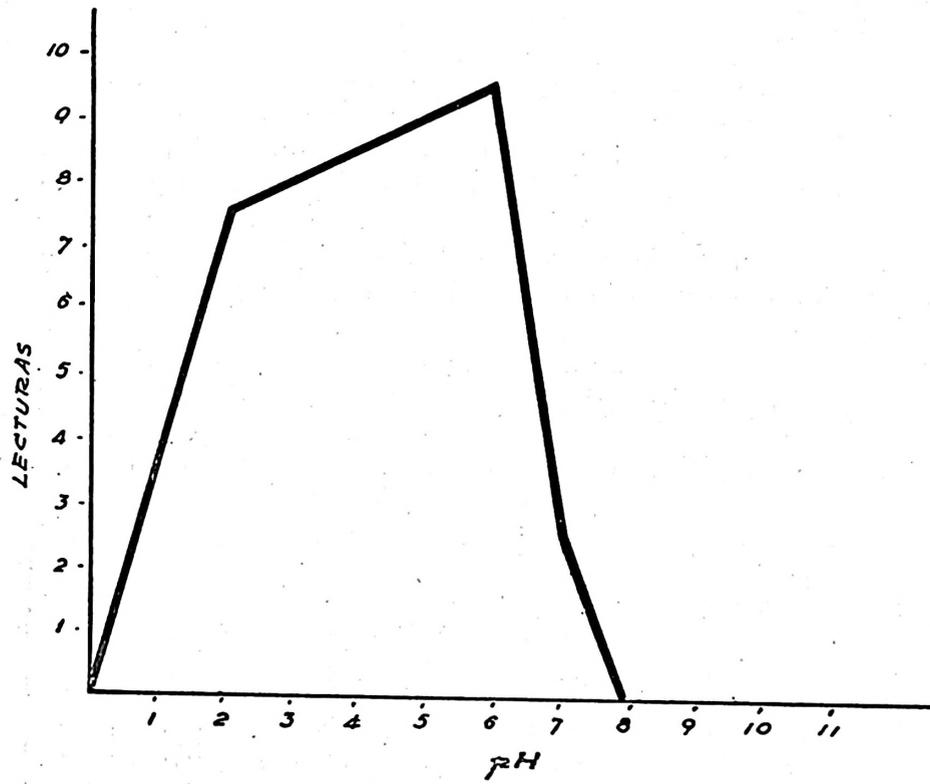
La gráfica 3 nos muestra la curva de valores de una solución de 0'15 γ de lactoflavina, a distintos pH, siendo el valor más alto el conseguido a un pH de 6, empezando luego otro descenso brusco, destruyéndose al instante la lactoflavina a un pH = 8.

Las curvas obtenidas a otras diluciones dan curvas de destrucción completamente iguales, siendo el pH óptimo el de 6.

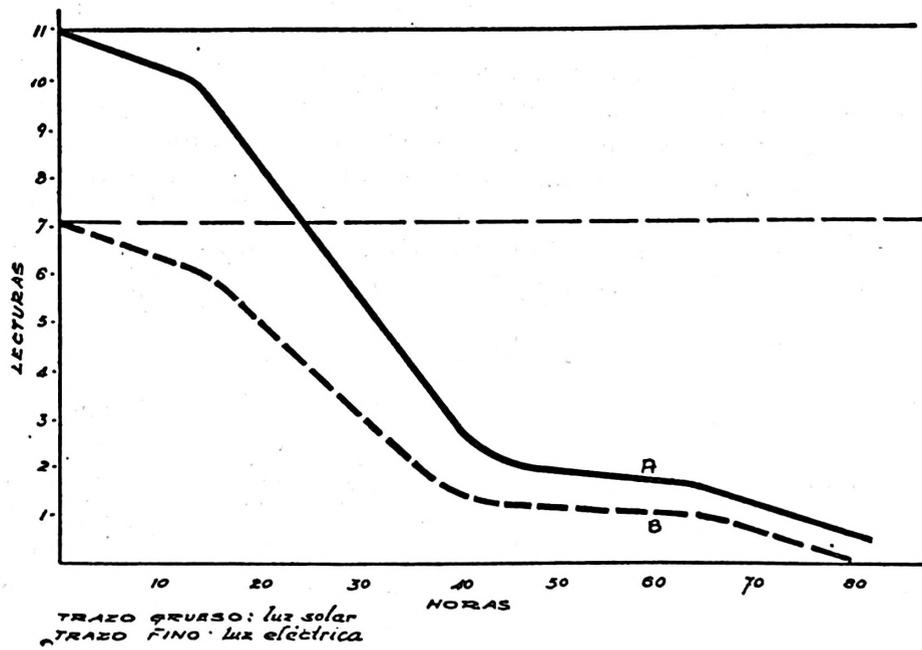
E) *Dstrucción de la lactoflavina por la luz.*

La gráfica 4 nos demuestra la pérdida de riboflavina en solución por acción de la luz solar.

La curva A) es la formada por los valores obtenidos con



Gráfica 3



Gráfica 4

una solución con 0'14 $\gamma/c.$ y la B) con otra 0'09 $\gamma/c.$ durante un período de tiempo que oscila entre 0 y 80 horas en que se han tenido las soluciones expuestas a la luz solar difusa.

Las mismas soluciones bajo la acción de la luz eléctrica han dado a las 80 horas, exactamente el mismo valor que en el momento de prepararlas, lo que demuestra claramente que no ha habido destrucción por acción de la luz.

F) *Sobre la acción de la luz solar sobre soluciones de lactoflavina a distintos pH.*

El cuadro VI nos da un resumen de las pruebas realizadas :

Tiempo Horas	pH				
	2	4	6	7	8
Recién preparada	6'5	7'5	8	7'5	1
A las 2 horas	0	1	7	7	1
A las 18 horas	0	0'5	5	4	1
A las 22 horas	0	0'5	0'5	0'5	0
A las 93 horas	0	0'5	0'5	0'5	0
A las 98 horas	0	0'25	0'25	0'25	0
A las 118 horas	0	00	0	0	0

Vemos que recién preparados en un pH alcalino la destrucción es momentánea, y por acción de la luz sucede el fenómeno antes en las soluciones ácidas que las que tienen un pH 6-7.

Realizada esta misma prueba, sometiendo las soluciones a la acción de la luz eléctrica, no se observó pérdida alguna, únicamente al cabo de una semana se comprobaron en los pH 2 y 4 ligerísimas pérdidas que no llegan a un 5 %.

Resumen

Se describen los fundamentos teóricos de las fluorofotometrías con aplicación a la evaluación de materiales conteniendo lactoflavina.

Brevemente se reseñan las características del aparato empleado para las determinaciones.

Se detalla la técnica seguida para la construcción de gráficas que permitan la evaluación de soluciones conteniendo lactoflavina, aun cuando también esté presente la vitamina B₁.

Se determina el tiempo necesario para que la lámpara adquiera su máximo de intensidad, unos 7 minutos aproximadamente.

La influencia del pH en las soluciones de lactoflavina se pone de manifiesto en la gráfica IV.

La labilidad de la lactoflavina a la luz solar queda de manera patente demostrada, valorando soluciones durante lapsos de tiempo comprendidos entre 0 y 80 horas.

Por último, se dan los valores obtenidos valorando soluciones de distintos pH expuestos a la luz solar, deduciéndose de ellos que a pH 6-7 es donde mejor se conserva la lactoflavina.

Summary

The theoretical foundations of the fluorophotometries with regard to the evaluation of materials containing lactoflavine are described.

The technics followed for the drawing of graphic representations which allow an evaluation of solutions containing lactoflavine, even though vitamin B₁ be present, are detailed.

The influence of the pH in solutions of lactoflavine is showed.

The lability of lactoflavine to sunlight is clearly demonstrated by evaluating solutions during periods of time from 0 to 80 hours.

Lastly, the values obtained by evaluating solutions with different pH exposed to sunlight are given, and from them one deduces that lactoflavine is best kept in a pH 6-7.

Bibliografía

- HODSON and NORRIS. — Jour. Biol. Chem., 131, 621, 1939.
CONNER and STRAUB. — Ind. Eng. Chem. Analytical Edition, 13, 385, 1941.
ANDREWS, NORDGREN. — Cereal Chemistry, 18, 686, 1941.
SULLIVAN and NORRIS. — Ind. Eng. Chem. Anal. Edit., 11, 535, 1939.
WHITNAH, KURNERTH and KRAMER. — J. Am. Chem. Soc., 59, 1153, 1937.
FARREBEE. — J. Clin. Invest., 19, 251, 1940.

